

66-

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

#6

(Translation)

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : March 25, 1996

Application Number : Heisei 8  
Patent Appln. No. 068809

Applicant(s) : DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL  
INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL  
RESOURCES, MINISTRY OF  
AGRICULTURE, FORESTRY AND  
FISHERIES

Wafer  
of the  
Patent  
Office

September 27, 1996

HISAMITSU ARAI

Commissioner,  
Patent Office

Seal of  
Commissioner  
of  
the Patent  
Office

Appln. Cert. No.

Appln. Cert. Pat. Hei 08-3067026

(Translation)

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : July 17, 1996

Application Number : Heisei 8  
Patent Appln. No. 187763

Applicant(s) : DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL  
INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL  
RESOURCES, MINISTRY OF  
AGRICULTURE, FORESTRY AND  
FISHERIES

Wafer  
of the  
Patent  
Office

November 8, 1996

HISAMITSU ARAI

Commissioner,  
Patent Office

Seal of  
Commissioner  
of  
the Patent  
Office

Appln. Cert. No.

Appln. Cert. Pat. Hei 08-3067028

Your File: 85760  
Our Ref: AR001US  
( )

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication

Laid-Open Publication Number: 7-250685

Laid-Open Publication Date: October 3, 1995

Title of the Invention: ANTI-BACTERIAL PLANT AND METHOD FOR  
PRODUCTION THEREOF

Application Number: 6-40190

Filing Date: March 10, 1994

Inventors: M. OHSHIMA ET AL.

Applicant: CHIEF OF NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL  
RESOURCES, MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND  
FISHERIES

[Claims]

[Claim 1] An expression cassette capable of expressing an anti-bacterial peptide derived from a Diptera insect which is not fused with another protein in a plant cell.

[Claim 2] An expression cassette according to claim 1, wherein the anti-bacterial peptide is either of Sarcotoxin IA, Sapecin, and an anti-fungal protein.

[Claim 3] An expression cassette according to claim 1 or 2, which is constructed so as to allow the anti-bacterial peptide to be secreted in a plant cell.

[Claim 4] An expression cassette according to claim 2 or 3, comprising a signal sequence of the Sarcotoxin IA and Sarcotoxin cDNA.

Your File: 85760  
Our Ref: AR001US  
(1)

[Claim 5] A vector having the expression cassette of either of claims 1 to 4.

[Claim 6] An anti-bacterial plant cell having the expression cassette of either of claims 1 to 4 or the vector of claim 5.

[Claim 7] An anti-bacterial plant having the expression cassette of either of claims 1 to 4 or the vector of claim 5.

[Claim 8] A plant according to claim 7, wherein the anti-bacterial plant is selected from the group consisting of tobacco, tomato, lettuce, chinese cabbage, rice, barley, wheat, potato, citrus fruit, peach, and apple.

[Claim 9] A method for producing anti-bacterial plant cell or an anti-bacterial plant, comprising the step of introducing the expression cassette of either of claims 1 to 4 or the vector of claim 5 into a plant cell.

[Claim 10] An anti-bacterial plant expressing at least one or two or more different anti-bacterial peptide, obtained by crossing the plant bodies of claim 7 or 8

(Page 2, right column, lines 25-33)

[Means for Solving the Problems] The inventors of the present invention earnestly studied the breeding of an anti-bacterial plant, using a DNA recombinant technique. As a result, we found that an anti-bacterial peptide produced by a Diptera insect has a remarkable effect on

Your File: 85760  
Our Ref: AR001US  
(1)

plant pathogen and DNA encoding the anti-bacterial peptide is introduced into a plant cell or a plant to provide it with resistance against various plant bacterial pathogens without inhibiting the growing thereof. Thus, we achieved the present invention.

(Page 6, right column, line 31 - page 7, right column, line 25)

[0052] (Example 6) (Resistance test against Pseudomonas syringae pv. tabaci in a plant with a Sarcotoxin gene introduced thereto)

Each surface of the leaves of transgenic tobacco of the R1 generation was scratched with a bundle of 60 fine needles, and Pseudomonas syringae pv. tabaci ( $5 \times 10^7$ /ml) was coated onto the scratched surface. Five days later, the degree of the symptom was determined. The result is shown in Table 4.

[0053]

[Table 4]

Strain\Symp tom	1	2	3	Total
PST10	10	54	55	119
S-sarcotoxin	1	19	16	36
S-12	0	6	19	25
4-15	0	3	19	22
35S-GUS	0	0	8	8
N o n - transgenic tobacco	0	0	8	8

Determination of the degree of the symptom

- 1: no symptom or a very light degree of halo
- 2: a middle degree of halo or a light degree of necrosis
- 3: a wide range of halo and necrosis

[0054] As a result, it was revealed that a Sarcotoxin gene was stably inherited from tobacco with the Sarcotoxin gene introduced thereto to a plant (R1) of the next generation obtained by self-pollination of the tobacco. Furthermore, it was revealed that the R1 plant in which the Sarcotoxin gene was expressed exhibited resistance against a pathogenic bacteria.

Your File: 85760  
Our Ref: AR001US  
(1)

[0055] Example 7 (Anti-bacterial test against E. Carotovora subsp. carotovora in an anti-bacterial tobacco)

Five milliliters of sterilized water was placed in sterilized plastic dishes having a diameter of 6 cm. Six anti-bacterial tobacco leaves which were cut in a circle shape with a diameter of 1 cm were well washed with deionized water and placed in the dish. These leaves were incubated at 28°C for 3 days with gentle agitation. To the dish  $10^6$  cell/ml of E. Carotovora subsp. carotovora had been added.

[0056] Three days later, a part of the leaves was taken and plated on an LB medium. Colonies were counted. Assuming that the initial number of cells (i.e.,  $10^6$ /ml) is 1, the result is shown as follow:

[0057]

[Table 5]

	Number of colonies
Initial	1
S-Sarco-1	55
4-15-1	82.5
4-15-2	87.5
S-12-1	1000
<hr/>	
control 1	6250
control 2	11250



Your File: 85760  
Our Ref: AR001US  
(1)

[0058] The number of colonies of the controls with no leaves added thereto decreased to 0.1 in three days. The controls refer to leaves derived from a non-recombinant tobacco plant.

[0059] The above result shows that Sarcotoxin IA is secreted to a cell gap from a leaf tissue of recombinant tobacco producing an anti-bacterial tobacco and dissolved in an aqueous solution containing E. Carotovora subsp. carotovora in the dish to inhibit the growth of the bacteria. More specifically, it is considered that a signal peptide of the anti-bacterial peptide is normally cleaved and secreted outside of a cell as a mature peptide to exhibit an anti-bacterial property.

AR00/05

①

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-250685

(43) 公開日 平成7年(1995)10月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
A 0 1 H 5/00	Z N A A			
C 0 7 K 14/435		8318-4H		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		7729-4B	5/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平6-40190	(71) 出願人	591127076 農林水産省農業生物資源研究所長 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
(22) 出願日	平成6年(1994)3月10日	(72) 発明者	大島 正弘 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内
		(72) 発明者	宇垣 正志 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内
		(72) 発明者	大橋 祐子 茨城県つくば市観音台2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内
		(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗菌性植物及びその作出方法

(57) 【要約】

【目的】 昆虫由来の抗菌性ペプチドを発現する、抗菌性植物体を得る。

【構成】 ザルコトキシニン I A のシグナル配列およびペプチドをコードする配列を C a M V の 3 5 S プロモーターに接続した高発現カセットを作成し、植物細胞に導入して抗菌性植物体を得る。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 双翅目昆虫由来の、他の蛋白質と融合していない抗菌性ペプチドを植物細胞で発現しうる、発現カセット。

【請求項 2】 前記抗菌性ペプチドが、ザルコトキシン I A、ザーベシンまたは抗真菌蛋白のいずれかである請求項 1 記載の発現カセット。

【請求項 3】 前記抗菌性ペプチドが植物細胞で分泌されるように構築された請求項 1 又は 2 に記載の発現カセット。

【請求項 4】 前記発現カセットが、ザルコトキシン I A のシグナル配列とザルコトキシン c DNA とを含む、請求項 2 又は 3 に記載の発現カセット。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 4 いずれかの項記載の発現カセットを有するベクター。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 4 いずれかの項記載の発現カセット又は請求項 5 のベクターを有する抗菌性植物細胞。

【請求項 7】 請求項 1 ないし 4 いずれかの項記載の発現カセット又は請求項 5 のベクターを有する抗菌性植物体。

【請求項 8】 前記抗菌性植物体がタバコ、トマト、レタス、白菜、イネ、オオムギ、コムギ、ジャガイモ、カンキツ類、モモ、およびリンゴからなる群から選ばれる請求項 7 に記載の植物体。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 4 いずれかの項記載の発現カセット又は請求項 5 のベクターを植物細胞に導入することを包含する抗菌性植物細胞又は抗菌性植物体を作成する方法。

【請求項 10】 請求項 7 又は 8 の植物体を交配させた抗菌性植物体であって、1 又は 2 以上の異なる抗菌性ペプチドを発現する植物体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、病原菌に対して耐性を有する植物細胞又は植物体に関する。更に詳しくは、昆虫の抗菌性ペプチドを発現し、病原菌に対して抵抗性を有する植物体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】農業の分野においては、食料の安定的供給確保のため病害虫、病原菌に対して抵抗性のある品種の改良、育種、農業開発が盛んに行われてきた。近年、植物バイオテクノロジー技術が発達し、特に組換え DNA 技術を利用して病害虫あるいは病原菌に対して、抵抗性のある植物を育種する試みがなされている。この組換え DNA 技術を用いて、すでに除草剤耐性（特開平 2-186925）、ウイルス抵抗性（特開平 4-330233）、害虫抵抗性（特開平 3-247220）などの形質転換植物が作出されている。しかし、病原菌（糸状菌、あるいは細菌）に対しては、病原菌の生産する毒素

2

に対してその不活化酵素遺伝子を導入する試みがなされており、（植物細胞工学 vol. 12, 713~720, 1990）、糸状菌に対する耐性植物は得られているが（Plant physiol., 104:109-118）、植物病原細菌に対して抗菌性を有する植物は得られていないのが実情である。現在までに植物の細菌病抵抗性遺伝子についての知見はほとんど得られておらず、従ってこのような細菌病抵抗性をもった植物は従来の育種法では作出が困難であり、遺伝子組換え手法を用いた植物の作出が待望されていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記従来の課題を解決するものであり、その目的とするところは以下の点：

（1）双翅目昆虫由来の、他の蛋白質と融合していない抗菌性ペプチドを植物細胞で発現しうる発現カセットを提供すること。

【0004】（2）前記発現カセットを有するベクターを提供すること。

【0005】（3）前記発現カセット又はベクターを有する抗菌性植物細胞を提供すること、および

（4）前記発現カセット又はベクターを有する抗菌性植物体を提供すること、にある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、DNA 組換え技術を用いて、抗菌性植物を育種することを目的として鋭意研究した結果、双翅目の昆虫が生産する抗菌性ペプチドが植物病原菌にも顕著な効果を有すること及び、この抗菌性ペプチドをコードする DNA を植物細胞又は植物体に導入することにより、該植物細胞及び植物体の生育が阻害されることなく、種々の植物病原菌に対して抵抗性を有することを発見して本発明を完成したものである。

【0007】本発明の発現カセットは双翅目の昆虫由来の、他の蛋白質と融合していない抗菌性ペプチドを植物細胞で発現しうるものであり、そのことにより、上記目的が達成される。

【0008】本発明のベクターは上記発現カセットを有するベクターである。

【0009】このことにより、上記目的が達成される。

【0010】本発明の抗菌性植物細胞は、前記発現ベクターを有する抗菌性植物細胞であり、このことにより、上記目的が達成される。

【0011】本発明の抗菌性植物体は前記発現ベクターを有する抗菌性植物体であり、このことにより上記目的が達成される。

【0012】更に、本発明の抗菌性植物細胞又は植物体は植物細胞に発現カセット又はベクターを導入することにより作出される。

【0013】又、本発明の抗菌性植物体は上記得られた

植物体を交配させて、1又は2以上の異なる抗菌性ペプチドを発現する植物体であり、そのことにより上記目的が達成される。

【0014】以下、本発明を詳しく説明する。

【0015】本発明の発現カセットは双翅目の昆虫由来の抗菌性ペプチドを発現しうる。好ましい双翅目の昆虫は、ハエ、カであり、入手の容易性からハエ、特にセンチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) が好ましい。抗菌性ペプチドとしては、センチニクバエに由来する、ザルコトキシニンIA、ザーベシン又は抗真菌蛋白が好ましい。尚、ここで抗菌性とは抗糸状菌性及び抗細菌性の両方をいう。「他の蛋白質と融合していない」とは、抗菌性ペプチドが、他の蛋白質、例えばβ-グルクロニダーゼ蛋白の全部又は一部と結合していないことをいう。このためには、抗菌性ペプチドはシグナル配列と結合していること、あるいは結合しているシグナル配列と抗菌性ペプチドが正しい位置でプロセッシングされることが必要である。好ましいシグナル配列はその抗菌性ペプチドのシグナル配列であるが、昆虫のシグナルペプチドが植物細胞で正確にプロセッシングされることは本発明において初めて明らかにされたものである。

【0016】シグナル配列を有する結果、抗菌性蛋白は分泌され得る。細胞間隙に分泌される結果、植物細胞に対する損傷を防ぎ、更に細胞間隙に侵入して植物体内で増殖する病原菌に対する抗菌活性が向上することが期待される。

【0017】「発現カセット」とは、上記抗菌性ペプチドが発現されるために必要なDNA配列の一群をいい、プロモーターDNA配列と抗菌性ペプチドをコードするDNA配列とが植物細胞で発現可能な状態で結合されているものであれば、いづれをも使用しうる。好ましくは特定の制限酵素で切断され、容易に回収されて、ベクターへの組換え、形質転換に用いられ得る。

【0018】好ましい発現カセットは、高発現プロモーターを有するカセットである。プロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、あるいはタバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来のPathogenesis-Related 1a (PR1a) 遺伝子プロモーターが好ましい。高発現のために、エンハンサーを使用し得る。エンハンサーとしては上記35Sプロモーター上流の配列を含むエンハンサー領域 (以下、En35S等という) が好適であり2個又はそれ以上を含み得る。7個連続して含むものも好適に使用しうる。発現カセットとしては図1に示すPST10、S-sarco、S12、4-15が挙げられる。

【0019】発現カセットの構築は、常法に従って行われ得る。例えば作成に用いるエンハンサーとしてCaMV 35S遺伝子のプロモーターの上流-417~-90

の領域又は-290~-90の領域を一単位として切り出し、これを35Sプロモーターの上流に結合することにより行う。35Sプロモーターの下流にタバコモザイクウイルス (TMV) のΩ配列を接続することにより、更に高発現するプロモーターカセットを構築し得る。

【0020】発現カセットを有するベクターは、前記発現カセットとベクター、例えばpBI系であるバイナリーベクター系又は中間ベクター系のようなアグロバクテリウムを介して植物に発現カセットを導入しうるもの、あるいはpUC系のようなベクターであって植物に直接導入し得るものが含まれる。

【0021】pBI系のベクターとしては、pBI121、pBI101、pBI101.2、pBI101.3などが挙げられる。

【0022】pUC系のベクターとしては、pUC19、pUC18、pUC9などが挙げられる。ベクターの構築はDNAの組換え技術の常法が使用され得る。

【0023】上記得られた発現カセットあるいはベクターを細胞に導入するには、アグロバクテリウムを介する方法と直接導入する方法とがある。アグロバクテリウムを介する方法は、例えばNagelらの方法を用い、エレクトロポレーションによって、まずベクターをアグロバクテリウムに導入しついで、形質転換されたアグロバクテリウムを、Plant Molecular Biology Manual (S. B. Gelvin et al., Academic Publishers) に記載されている方法で、植物細胞に導入する方法である。

【0024】発現カセットを直接、植物細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法がある。

【0025】発現カセットあるいはベクターを導入された植物細胞は、カナマイシン耐性等でまず選択され、次いで、植物体を再生させる。この植物体にモデル菌、例えばタバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* PV. *tabaci*) を細針を用いて接種し、5日後にコントロールの植物体と比較して接種による変化が認められないもの或いは軽度のハローが形成されるものを選択することによって選択しうる。又、ノーザン法により、導入した遺伝子の発現を検出しうる。

【0026】本発明に使用し得る植物としては、単子葉植物及び双子葉植物のいづれをも使用し得る。特に好ましい植物としては、カンキツ類、白菜、レタス、タバコ、モモ、イネ、ジャガイモ、トマト、オオムギ、コムギおよびリンゴが挙げられる。例えば、ザルコトキシンはこれらの植物の病原菌に対して抗菌性を有するとともに、けん濁培養細胞を用いた場合100μg/mlの濃度でも生育阻害をおこさないからである。

【0027】抗菌性ペプチドの発現ベクターを導入された植物体を自家受粉又は交配して、第2世代の植物体を

得ることができる。この場合、異なる抗菌性ペプチドを有する発現カセットを有する植物体を交配することにより、より抗菌性が強化された植物体を得られる。ザルコトキシンIAと抗真菌蛋白の組みあわせが好ましい。

【0028】以下実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

【0029】

【実施例】

(実施例1) (ザルコトキシンIAの各種病原菌に対する活性)

\*10 【表1】

植物病原菌		阻害円の直径(mm)	
		ザルコトキシン 10 $\mu$ g	IA 5 $\mu$ g
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> (1079)	カンヤツカイヨウ病	13.0	11.0
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (1393)	白菜軟腐病	11.5	10.3
<i>P. cichorii</i> (1369)	レタス腐敗病	10.8	10.0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (1075)	タバコ野火病	10.8	9.5
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> (1352)	レタス斑点細菌病	10.8	9.5
<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i> (1420)	モモせん孔細菌病	10.5	9.3
<i>E. coli</i> K12	大腸菌	10.0	9.0
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i> (1230)	イネ白葉枯病	9.5	8.8
<i>P. solanacearum</i> (KN 117)	ジャガイモ青枯病	0	0

【0031】なお、合成ザルコトキシンIAは、天然のC末端のアミドをカルボキシル化したものである。

【0032】(実施例2) (抗菌性ペプチド存在下での培養細胞の増殖)

ザルコトキシンIAまたはザーベシンの濃度を変えて、単子葉植物であるイネの、および双子葉植物であるタバコのけん濁培養細胞に対する生育阻害を調べた。50ml三角フラスコにいた10mlの培養細胞に、合成ザルコトキシンIAを20 $\mu$ g/mlまたは100 $\mu$ g/mlになるように添加し、28℃で1週間培養し、細胞の増殖をpacked volumeを測定することにより調べた。タバコ培養細胞におけるザルコトキシンIAの阻害効果を実施例として図2に示した。この結果、用いた濃度下ではザルコトキシンIAはタバコ培養細胞の増殖を全く阻害しないことが示された。またイネについても全く同様の結果が、さらにザーベシンの用いたタバコ、イネ細胞に対する効果も上記と全く同様の結果が得られた。

【0033】(実施例3) (ザルコトキシンIA発現カセットの構築)

(1). シグナルペプチドを有するザルコトキシンIAコーディング配列の調製

本発明者らによってクローニングされた、ザルコトキシ

\*50℃のPD培地(ポテトデキストロース培地、1.8%寒天)12mlに10<sup>8</sup> cell/mlの表1に記載の病原菌懸濁液2mlを加え、ステンレス円筒をおいた直径9cmのシャーレに流して固めた。ステンレス円筒を引き抜いたあとにできた穴に、注意深く合成ザルコトキシンIA5 $\mu$ g、10 $\mu$ gをそれぞれ含む溶解したサンプルを注いだ。25℃で培養し、2日おきに阻止円を測定した。8日後の結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

ンIAのcDNA(Biochem. J. 239, 717(1986))を含むpTO19を鋳型として、配列番号:1および配列番号:2に示すプライマー1およびプライマー2を用いたPCR反応により、上記ザルコトキシンIA cDNAの5'末端にBamHIサイト、および3'末端にSacIサイトを有する、DNA断片を調製した。反応液の組成を表2およびPCR反応条件を表3に示す。

【0034】

【表2】

反応液の組成

精製水	85 $\mu$ l
pTO19	1 $\mu$ l (0.1 $\mu$ g)
10 $\times$ Taq バッファー	10 $\mu$ l
10mM dNTP	1 $\mu$ l
20 $\mu$ M プライマー1	1 $\mu$ l
20 $\mu$ M プライマー2	1 $\mu$ l
Taq ポリメラーゼ	1 $\mu$ l (2.5 u)
(promega)	

【0035】

【表3】

## PCR反応条件

サイクル数 1 94℃×1分  
 サイクル数 25 94℃×1分 → 50℃×1分 → 72℃×1分  
 サイクル数 1 72℃×3分

【0036】同様の手法により、シグナルペプチドを有するザルコトキシニンIAコーディング配列およびそれ自身のターミネーター配列より成るザルコトキシニンIA cDNAの5'末端にBamHIサイト、および3'末端にEcoRIサイトを導入したDNA配列を調製した。

【0037】(2) 上記コーディング領域と高発現プロモーター領域との連結による発現カセット作製  
 本発明者らにより構築され、1993年度日本育種学会大会で報告した高発現プロモーターを含む、pBI121 (clontech社) 由来のベクターを図3に示す。図中のP<sub>nos</sub>は、ノバリンシンテターゼ遺伝子のプロモーター領域、NP<sub>TII</sub>はネオマイシンホスホトランスフェラーゼIIコーディング領域、T<sub>nos</sub>はノバリンシンテターゼ遺伝子のターミネーター領域を表す。

【0038】E1はCaMV35Sプロモーターのエンハンサー領域(-417~-90)を表し、本ベクターでは該領域はタンデムに連結されている。(J. Biotechnology 14 333 (1990))。P35Sは、上記35Sプロモーター領域(-90~-1)である。Ωは、タバコモザイクウィルスのオメガ配列(Gene, 217, 217 (1987))を表す。図3のベクター中のP35Sを含むHindIII/BamHI断片を発現カセットのプロモーター配列とした(図1のPST10の発現プロモーターとして使用した)。

【0039】次に、発現効率の高いプロモーターを構築するため、CaMV35Sプロモーターエンハンサー領域(-290~-90)を多重連結した。エンハンサー領域(-290~-90)を7つ連結し、その上流にさらにCaMV35Sプロモーター(約650bp)(E35S)を連結したプロモーターを農業生物資源研究所、廣近洋彦博士より分与を受けた(図1のS-Sarcoの発現プロモーターとして使用した)。

【0040】次に感染特異的タンパク(PRタンパク)PR1aをコードするゲノムDNAを含むプラスミドpPR-γ(Febbs Letter, 225, 243 (1987))を鋳型とし、配列番号: 7に示すプライマー7及び配列番号: 8に示すプライマー8を用いたPCR反応により、PR1aプロモーター930塩基対を含み、翻訳開始コドンの1塩基上流までのDNA断片を調製した。本断片の5'末端はXhoIサイトとなっており、3'末端はBamHIサイトとなっている。一方

同じプラスミドpPR-γより、プロモーター領域の-2400から-902までの領域を含むDNA断片をEcoRI及びXhoIによって切り出した。このDNA断片の5'末端はEcoRIサイトであり、3'末端はXhoIサイトとなっているため、上記930塩基対を含むDNA断片と結合した。更にこの結合された断片の5'末端を通常的手法によってHindIIIサイトに変換した。その結果最終的に本DNA断片はPR1a遺伝子のプロモーター領域の-2400から翻訳開始コドンの1塩基上流までを含み、5'末端はHindIIIサイトおよび3'末端はBamHIサイトを有する。

【0041】以上で得られたプロモーター配列と(1)で得られたザルコトキシニンIAコーディング配列とを互いのBamHIサイトで常法により結合させた。

【0042】さらに上記pPR-γを鋳型として、配列番号: 3に示す、プライマー3および配列番号: 4に示す、プライマー4を用いて上記と同様のPCR反応によりPR1aのプロモーター930塩基対およびシグナルペプチドをコードするDNA断片で調製した。本断片は5'末端にBamHIサイトを有し、3'末端は平滑末端となっている。一方、ザルコトキシニンIA成熟ペプチド部分は、上記と同様に配列番号5: に示すプライマー5および配列番号6に示すプライマー6を用いたPCR反応により調製した。本断片の5'末端は平滑末端となっており、3'末端はEcoRIサイトとなっている為、PR1a遺伝子のプロモーター配列およびシグナルペプチドをコードするDNA断片と結合した。

【0043】以上により本発明の発現カセット、PST10、S-Sarco、S-12、4-15を得た。コントロール発現カセットとしてpBI121の35S-GUS領域を得た。これらの構造を図1に示す。図中のEn35Sは、CaMV35Sプロモーターのエンハンサー領域(-417~-90)、P35Sは、CaMV35Sプロモーター(-90~-1)、Ωはタバコモザイクウィルスのオメガ配列(Gene, 217, 217 (1987))、SigはザルコトキシニンIAのシグナルペプチドコーディング領域、SarcotoxinはザルコトキシニンIAの成熟ペプチドコーディング領域、T<sub>nos</sub>がノバリンシンテターゼ遺伝子のターミネーター領域、EnはCaMV35Sプロモーターのエンハンサー領域(-290~-90)、E35SはCaMV35Sプロモーター(約650bp)領域、T<sub>ra</sub>はPR1aのターミネーター領域、S-12におけるPR1a

は、約2.4 kbのPR1aプロモーター領域、TsarcoはザルコトキシンI AcDNAのターミネーター領域、4-15におけるPR1aは、約0.99 kbのPR1aプロモーター領域、SigPRは、PR1aシグナルペプチド領域、およびコントロールにおけるGUSは、 $\beta$ -グルクロニダーゼ構造遺伝子を表す。

【0044】(3)発現カセットのpBI121への導入

市販のpBI121をHindIII-EcoRIで切断し、pBI121のCaMV35SプロモーターおよびGUSを除いた後、上記(2)で作製した発現カセットをHindIII-EcoRIに導入した。

【0045】実施例4(発現カセットのタバコへの導入による組換えタバコの作成)

(1) *Agrobacterium tumefaciens*の形質転換

*Agrobacterium tumefaciens*のLBA4404株(ontech社)を250  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンと50  $\mu$ g/mlのリファンピシンを含むL培地中、28℃で培養し、Nagleら(Microbiol. Lett., 67, 325 (1990))の方法に従って、細胞懸濁液を調製し、実施例3で作成した各発現カセットを含むプラスミドを各々エレクトロポレーションにより、上記菌株に導入した。上記L培地で28℃、3日培養し、各々形質転換体を得た。

【0046】(2)タバコの形質転換

上記(1)で得られた形質転換*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404をYEB培地(DNA cloning 第2巻78頁)で振とう培養(28℃, 200 rpm)した後、滅菌水で20倍に希釈し、タバコ(*Nicotiana Tabacum* Sammsun NNを供試)の葉片を共存培養した。2~3日後、抗生物質を含む培地で上記細菌を除去し、2週間ごとに選択培地で継代し、形質転換したタバコ細胞を選抜し、常法によりカルスを誘導し、植物体に両分化した。本明細書では、これらカルスより再分化した植物体をR0世代と規定する。

【0047】得られた再分化植物は、順化し、自家受粉させ、R0世代の自殖次世代を得た。本明細書中ではこの世代をR1世代と規定する。

【0048】図1中の各発現カセットが導入された組換えタバコのいずれの系統もR1世代の種子を多数得た。これらは、カナマイシン含有(100  $\mu$ g/ml)MS寒天培地上に播種し、各発現カセットを伴に導入されたpBI121由来のNPYII発現によるカナマイシン抵抗性の有無で発現カセットの導入されたR1のみを選択し栽培を行った。

【0049】(実施例5)(R1世代組換えタバコのノーザン解析)

R1世代で、上記の各発現カセットがmRNAレベルで発現することを確認する為、ノーザン解析を常法により行った。プローブとして、本発明の発現カセット中に含まれるザルコトキシン成熟ペプチドコーディング領域を $\alpha$ -32PdCTPでRIラベルした断片を使用した。

【0050】解析結果のオートラジオグラムを図4に示す。レーン1はコントロール植物、レーン2は図1の35-GUS導入タバコ、レーン3は図1のS-Sarco導入タバコ、およびレーン4~7は図1のPST10導入タバコの各々R1世代である(カナマイシン抵抗性)、また、レーン8は、図1のS-Sarco導入タバコの次世代であるが、カナマイシン感受性のR1世代である。

【0051】レーン1、2および8ではシグナルが認められず、レーン3~7に明確な上記プローブとハイブリダイズするシグナルが認められる。従って、本発明の発現カセットは安定して自殖次世代植物に遺伝継承され得る。

【0052】(実施例6)(ザルコトキシン遺伝子を導入した植物のタバコ野火病菌抵抗性の検定)

R1世代の形質転換タバコの葉の表面に、60本の細針の束で傷をつけ、野火病菌(5  $\times$  10<sup>7</sup>/ml)を傷面に塗布した。5日後に病徴の程度を判定した。結果を表4に示す。

【0053】

【表4】

系統名 \ 病徴	1	2	3	合計
PST10	10 本	54 本	55 本	119 本
S-ザルコトキシシ	1	19	16	36
S-12	0	6	19	25
4-15	0	3	19	22
35S-GUS	0	0	8	8
非形質転換タバコ	0	0	8	8

## 病徴の程度の判定。

- 1 : 病徴なし、又は極く軽度のハロー  
 2 : 中程度のハロー、又は軽度の壊死  
 3 : 広い範囲のハロー、及び壊死

【0054】この結果、ザルコトキシシ遺伝子が導入されたタバコから、自家受粉によって得られた次世代(R1)植物に安定してこの遺伝子が遺伝し、しかもこれがR1植物で発現することにより細菌病抵抗性が示されたことが明らかになった。

【0055】実施例7(抗菌性タバコの軟腐病菌に対する抗菌性試験)

6cmの滅菌プラスチックシャーレ中に5mlの滅菌水をいれ直径1cmの円状に切りぬいた抗菌性タバコの葉を6枚を脱イオン水でよく洗浄した後いれて、3日間、28℃でゆるやかに浸透しながらインキュベートした。この中には当初 $10^6$  cell/mlの軟腐病菌(E.

*Carotovora* subsp. *carotovora*)を加えておいた。

【0056】3日後、その一部をとり、LB培地にまいてコロニーをカウントした。当初の細胞数を $10^6$ /mlを1として、以下に結果を示す。

【0057】

【表5】

当初	コロニー数
S-Sarco-1	55
4-15-1	82.5
4-15-2	87.5
S-12-1	1000
control 1	6250
control 2	11250

配列

ACGTGGATCC AACATGAATT TCCAGAACAT TTT  
C 34

【0063】

【配列番号：2】

配列の長さ：35

配列

ACGTGAGCTC TTAACCTCTG GCTGTAGCAG CAACA

【0064】

【配列番号：3】

配列の長さ：30

\*【0058】尚、葉を加えないコントロールは3日間で0.1に減少した。コントロールとは非組み換えタバコ植物由来の葉である。

【0059】上記の結果は、抗菌性ペプチドを生産している組換えタバコの葉組織からザルコトキシシIAが細胞間隙に分泌され、シャーレ中の軟腐病菌を含む水溶液中に溶け出したために、この細菌の増殖を阻害したことを示している。即ち、この抗菌性ペプチドのシグナルペプチドが正常に切断され、成熟ペプチドとして細胞外に分泌されることにより抗菌性が示されたものと考えられる。

【0060】

【発明の効果】本発明の発現カセット、ベクターを植物細胞を導入することにより、昆虫由来の抗菌性ペプチドを生産する植物体 that 得られる。病原菌に抵抗性のある植物新品種が提供される。

【0061】

【配列表】

【0062】

【配列番号：1】

配列の長さ：34

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：プライマー

※配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：プライマー

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：プライマー



13

14

配列

CCAGAAGCTT GATTTCAAAC TCTAGCTTCA

30

【0065】

【配列番号：4】

配列の長さ：20

\* 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：プライマー

配列

GGCACGGCAA GAGTGGGATA

20

【0066】

【配列番号：5】

配列の長さ：20

※ 配列の型：核酸

10 トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：プライマー

配列

GGTTGTTGA AAAAGATTGG

20

【0067】

【配列番号：6】

配列の長さ：30

☆ 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：プライマー

配列

TAGCGAATTC CTTAAAATTT TTATTACAAT

30

【0068】

【配列番号：7】

配列の長さ：24

☆ 配列の型：核酸

20 トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：プライマー

配列

AGCTCTCGAG GATTTCAAAC TCTA

24

【0069】

【配列番号：8】

配列の長さ：28

◇ 配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

◇ 配列の種類：プライマー

配列

AGCTGGATCC GACTATAGGA GAAATGTT

28

【図面の簡単な説明】

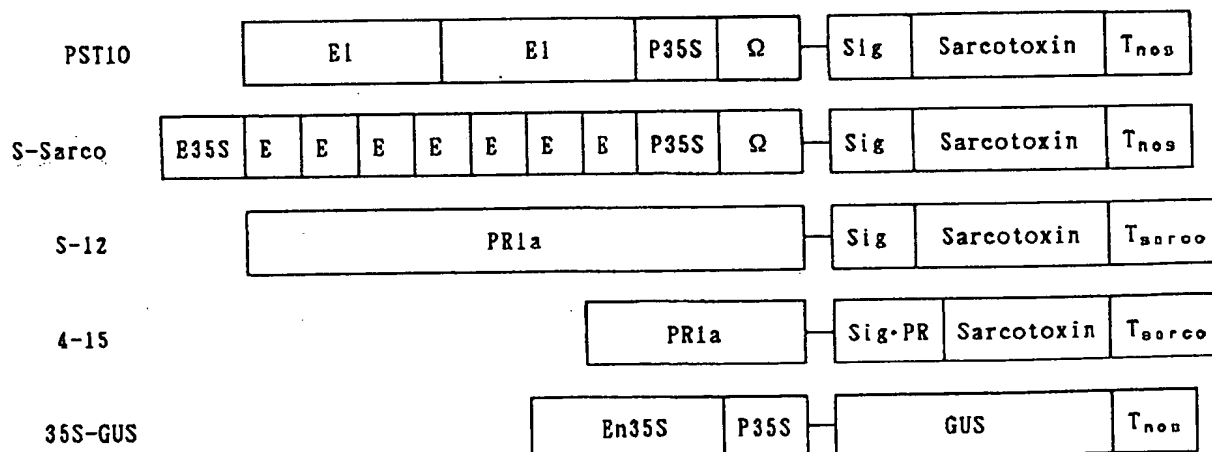
【図1】 本発明の発現カセットを示す。

【図2】 ザルコトキシンのタバコの成育に対する影響を示す図である。

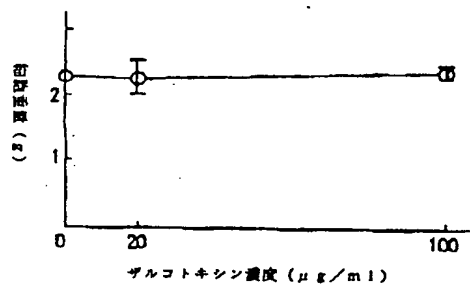
【図3】 pB1121由来のベクターを示す。

30 【図4】 ノーザン解析によるオートラジオグラムを示す。

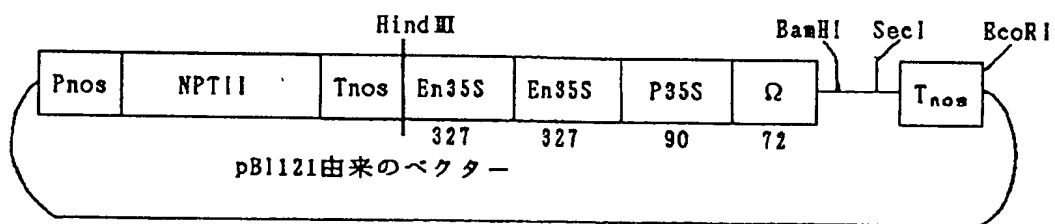
【図1】



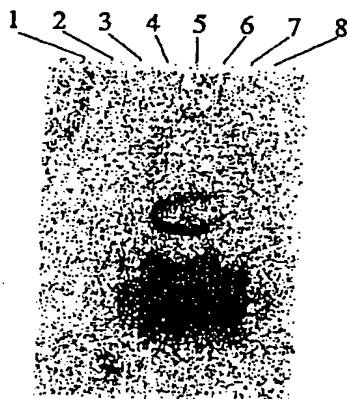
【図2】



【図3】



【図4】



- 1: control
- 2: 35S-GUS
- 3: SA-22
- 4: PST10-6-1-14
- 5: PST10-7-1-11
- 6: PST10-7-1-21
- 7: PST10-3-3-1
- 8: SA-14(Km<sup>r</sup>)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 5/10

// C 1 2 P 21/02

C 9282-4B

(72)発明者 名取 俊二

茨城県北相馬郡利根町布川2208-19